

ENSAIOS *IN VITRO* COM EXTRATOS BRUTOS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS DO CERRADO SUL-MATO-GROSSENSE SOBRE *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS* (Canestrini, 1887)

BARBOSA, Carolina da Silva¹; BORGES, Ligia Miranda Ferreira²; MIGUITA, Carlos. Henrique³; GARCEZ, Fernanda Rodrigues³; GARCEZ, Walmir Silva³; VIOLANTE, Ivana Maria Povoá³, ALVES, Reginaldo Dias⁴ NICÁCIO, José⁵

¹Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da UFG csbarbosa@uems.br;

²Laboratório de Parasitologia Veterinária IPTSP/UFG borges.ligia@gmail.com;

³Laboratório de Química/UFMS fernandargarcez@gmail.com;

⁴Parasitologia Animal/UEMS e ⁵Grupo de pesquisa em insetos frugívoros,UFGD jose.nicacio1@uol.com.br.

Palavra chave: carrapato, fitoterápicos, substâncias

INTRODUÇÃO

O ácaro *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) provoca perdas para a bovinocultura brasileira de aproximadamente dois bilhões de dólares anuais (MARTINS et al., 2006). É considerado o único ixodídeo transmissor dos agentes causadores da Tristeza Parasitária Bovina, e dependendo do quadro clínico pode provocar aborto e até óbito (BARROS et al., 2006). A principal forma de controle deste ácaro é através do uso de acaricidas químicos, porém, o desenvolvimento e seleção de resistência em cepas de *R. microplus* em diferentes regiões do mundo, têm levado à ineficiência de diversas bases químicas (FAO, 2004). O interesse na pesquisa de acaricidas derivados de plantas surgiu da necessidade de solucionar falhas decorrentes do uso intenso e prolongado dos produtos químicos sintéticos (OLIVO et al., 2009). Os extratos vegetais apresentam inúmeras vantagens quando comparados com o uso de produtos sintéticos porque são obtidos a partir de recursos renováveis e rapidamente degradáveis; o desenvolvimento de resistência de pragas a essas substâncias é um processo lento, consistem em uma associação de vários princípios ativos que atuam sem deixar resíduos nos alimentos; não danificam o ecossistema; além de que podem reduzir os custos de produção (BALANDRIN et al., 1985; CHAGAS et al., 2003; OLIVO et al., 2009). A aplicação dos defensivos vegetais na medicina veterinária ainda é um processo discreto, mas, sobre algumas pragas como os carrapatos as pesquisas têm acontecido de forma marcada e com resultados promissores, especialmente para o controle de *R. microplus*, no Brasil e no mundo (BALANDRIN et al., 1985; BORGES et al., 1994; MULLA & SU 1999; BORGES et al., 2005; SOUSA et al.,

2008). O objetivo da pesquisa foi isolar princípios ativos de plantas que interferissem no ciclo produtivo de *R. microplus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem das plantas e obtenção dos extratos

As plantas foram coletadas em Aquidauana, Campo Grande e Mundo Novo, e pertenciam às famílias Asteraceae, Bignoniaceae, Burseraceae, Clusiaceae, Combretaceae, Dilleniaceae, Erythroxylaceae, Fabaceae, Lauraceae, Lamiaceae, Loganiaceae, Malpighiaceae, Meliaceae, Myrsinaceae, Nymphaeaceae, Proteaceae, Rubiaceae, Sapindaceae, Sapotaceae, Siparunaceae, Sterculiaceae, Solanaceae, Verbenaceae e Vochysiaceae, das quais foram obtidos 77 extratos etanólicos, oriundos de diferentes partes (folhas, galhos, flores, frutos, raízes, sementes e ou associações de partes anatômicas).

Soluções testes para selecionar o extrato com ação superior a 95%

Na triagem foi utilizada solução a 0,20% e aquele que atingiu ação superior a 95% foi particionado e testado a 0,20; 0,10; 0,05 e 0,025%; aquela que atingiu 95% foi fracionada através da técnica de cromatografia em colunas de sílica e testada a 0,10; 0,050; 0,025 e 0,0125%. A partir desta foram obtidas as substâncias aplicando a técnica de ressonância magnética nuclear da fração e testadas a 0,005; 0,0025; 0,00125 e 0,000625% (primeiro grupo=quatro substâncias) e a 0,010; 0,005; 0,0025 e 0,00125% (segundo grupo= duas substâncias).

Ensaio com os carrapatos

Utilizaram-se fêmeas ingurgitadas obtidas de animais sem exposição a acaricidas por no mínimo 60 dias. Nos ensaios da triagem foram utilizados 120 ácaros (tratados e controle), nos demais foram utilizados 30 carrapatos em cada concentração (triplicata de dez). A Percentagem de Eficácia do Produto (PEP) dos extratos foi determinada através do cálculo da reprodução estimada, proposto por (Drummond et al., 1973).

RESULTADOS PARCIAIS E DISCUSSÃO

1. Triagem das plantas

Dos 77 extratos avaliados, 11 apresentaram eficácia acima de 6%, com destaque para o extrato dos frutos de *Guarea kunthiana* Juss da família Meliaceae com PEP de 99,1%, devido à redução da postura e comprometimento da embriogênese. Este efeito é considerado um registro inédito deste gênero e espécie quanto à bioatividade sobre *R. microplus*. Os demais extratos que tiveram eficiência

sobre o ácaro, embora com menor efeito, foram caule de *Nymphaea amazonum* (51,6%), cascas + caule de *Strychnos cf. pseudoquina* (48,0%), caule de *Nectandra gardneri* (34,5%), folhas de *Ocotea lancifolia* (16,4%), folhas de *Vernonia ferrugínea* (11,5), folhas de *Chrysophyllum marginatum* (10,8%), folhas de *Strychnos cf. pseudoquina* (9,7%), folhas de *Ocotea velloziana* (9,6%), folhas de *Siparuma guianensis* (9,5%) e folhas de *Solanum licocarpus* (8,0%).

Estudos realizados por Coelho et al.(2009), utilizando extrato etanólico do caule e fruto da *G. kunthiana* na dose de 500 mg/mL não tiveram efeitos sobre larvas de *Aedes aegypti*. Também Coelho et al. (2006) realizaram ensaios com extrato etanólico com 50 mg/mL da raiz e do caule sobre ninfas de *Rhodnius milesi* com baixa ação (20 a 25%) de mortalidade. Desta família, *Melia azedarach* foi estudada por Borges et al., (2003) sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Foi verificada elevada taxa de mortalidade de larvas e alta eficácia sobre fêmeas ingurgitadas, sendo que o extrato não matou a fêmeas, mas inibiu total ou parcialmente a produção de ovos e a embriogênese. Ainda sobre este carrapato Williams (1993), utilizando 0,54µg de extrato etanólico das sementes de *Azadirachta indica* (Meliaceae) provocou 50% de inibição da postura e 80,42% da eclodibilidade.

2. Ensaio com as partições, frações e substâncias da *G. kunthiana*

Do extrato etanólico do fruto da *G. kunthiana*, realizaram-se partições, frações e isolamento das substâncias (Tabela 1). Dos ensaios com as partições, com o extrato hexânico, se obteve a PEP de 100% na concentração inicial.

O extrato hexânico foi particionado em nove e testado em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*; das quais, a quinta partição apresentou um PEP de 99,9±0,0%. Desta partição, prosseguiram-se os processos químicos para o isolamento das substâncias, que foram em torno de seis divididas em dois grupos, pelas diferenças de massas. Destas, a sub-7 na primeira concentração atingiu índice de eficiência de 99,2±0,7%. Encontraram-se os mesmos efeitos sobre a redução de postura e alterações na embriogênese, ocorridas desde a triagem inicial, confirmando que essa substância é a responsável pela a ação biológica desta planta. Novos estudos são necessários para padronização farmacológica de formulação para ensaios *in vivo*, visando a obtenção de um produto comercial. O isolamento de substâncias a partir de plantas é um processo minucioso, desde a identificação das espécies vegetais, utilização de técnicas de laboratório demoradas e de alto custo para isolamento dos compostos, disponibilidade de elevado número de carrapatos

no padrão adequado e execução de numerosos ensaios o que demanda a participação de equipes interdisciplinares e interinstitucionais especializadas.

Conclusão

O fruto da *G. kunthiana* contém substâncias bioativas capazes de interferir no ciclo reprodutivo de *R. microplus* com ação superior a 95%.

Tabela 1 - Média \pm Desvio Padrão dos Percentuais de Eficiência do Produto (PEP) das partições, frações e substâncias de *G. kunthiana* do Cerrado Sul-Mato-Grossense, com bioatividade sobre *R. microplus*.

Partições (extratos)	Concentrações (%)			
	0,20	0,10	0,05	0,025
Etanólico	99,5 \pm 0,3	90,2 \pm 6,8	89,0 \pm 4,1	44,6 \pm 9,2
Hexânico	100,0\pm0,0	98,8\pm2,0	98,3\pm1,7	46,3\pm28,9
Diclorometânico	50,5 \pm 7,9	51,7 \pm 6,3	19,9 \pm 33,1	14,2 \pm 9,2
Metanol/água	16,5 \pm 4,1	17,6 \pm 7,9	10,7 \pm 1,0	3,8 \pm 16,8
Aquoso	1,5 \pm 3,5	0,4 \pm 1,1	0,6 \pm 1,8	0,8 \pm 3,5
Frações	Concentrações (%)			
	0,10	0,050	0,025	0,0125
GKFSa 1	9,1 \pm 14,0	5,8 \pm 2,0	5,9 \pm 6,9	3,0 \pm 4,6
GKFSa 2	25,8 \pm 8,2	13,7 \pm 8,1	1,5 \pm 3,1	8,9 \pm 5,4
GKFSa 3	15,2 \pm 6,4	10,2 \pm 8,6	10,5 \pm 6,0	3,4 \pm 11,7
GKFSa 4	98,9 \pm 0,1	97,7 \pm 1,3	95,9 \pm 3,1	64,5 \pm 13,8
GKFSa 5	99,9\pm0,0	98,9\pm0,2	99,0\pm0,0	76,1\pm7,3
GKFSa 6	11,7 \pm 5,9	2,0 \pm 8,1	1,4 \pm 10,1	1,6 \pm 6,9
GKFSa 7	19,0 \pm 13,6	11,0 \pm 8,8	10,3 \pm 0,9	0,1 \pm 8,1
GKFSa 8	11,6 \pm 13,0	12,8 \pm 15,5	5,0 \pm 6,5	1,5 \pm 15,5
GKFSa 9	24,9 \pm 4,6	18,5 \pm 3,1	17,0 \pm 11,3	7,8 \pm 7,0
Substâncias	Concentrações (%)			
	0,005	0,0025	0,00125	0,00625
Sub 1	8,9 \pm 2,9	7,7 \pm 12,0	2,6 \pm 3,0	2,1 \pm 4,8
Sub 4	12,5 \pm 5,2	10,5 \pm 1,1	6,3 \pm 4,2	4,1 \pm 3,7
Sub 5	9,3 \pm 19,2	7,0 \pm 10,7	2,1 \pm 7,8	1,5 \pm 4,9
Sub 6	2,4 \pm 11,3	2,1 \pm 13,7	1,5 \pm 1,0	1,4 \pm 0,4
	Concentrações			
	0,01	0,005	0,0025	0,00125
Sub 7	99,2 \pm 0,7	96,1 \pm 0,9	88,4 \pm 8,1	69,6 \pm 11,8
Sub 8	29,7 \pm 15,8	22,2 \pm 2,0	14,0 \pm 10,2	10,9 \pm 5,6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARROS, C. S. L.; DRIEMEIER, D.; DUTRA, I. S.; LEMOS, R. A. A. Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil. Brasil, 1. ed. **Montes Claros**, MG: Vallée, p. 87-95, 2006.
2. BORGES, L. M. F.; FERRI, P. H.; SILVA, W. C.; SILVA, W. J.; MELLO, L. S.; SOUZA, L. A. D.; SOARES, S. F.; FARIA, K, A.; GOMES, N. A.; MORI, A.; SILVA, N. F. Ação do extrato hexânico de frutos maduros de *Melia azedarach* (Meliaceae) sobre *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) em bezerros infestados artificialmente. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 1, p. 53-59, 2005.
3. BORGES, L. M. F.; FERRI, P. H.; SILVA, W. J.; SILVA, W. C.; SILVA, J. G. In vitro efficacy of extracts of *Melia azedarach* against the tick *Boophilus microplus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, p. 228-231, 2003.
4. BORGES, L. M. F.; SILVA, A. C.; NEVES, B. P. Teste “in vitro” de eficácia de cinamomo (*Melia azedarach*, L) sobre fêmeas ingurgitadas do *Boophilus microplus*, Can. (Acari: Ixodidae). **Revista de Patologia Tropical**, v. 23, n. 2, p. 175-179, 1994.
5. DRUMMOND, R. O.; ERNEST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J.; GRAHAM, O. H. *Boophilus microplus annulatus* and *Boophilus microplus*: Laboratory tests for insecticides. **Journal Economical Entomology**. 66, 130-133, 1973.
6. FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations, Module 1. Ticks: acaricide resistance: diagnosis management and prevention. In: **Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants**. Rome: FAO Animal Production and Health Division, 2004.
7. MARTINS, J. R. S.; FURLONG, J.; LEITE, R. C. Controle de carrapatos. In. BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. Carrapatos de importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: **Instituto Butantam**, São Paulo, Cap 9, p. 223, 2006.
8. MULLA, M. S.; SU, T. Activity and biological effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. **Journal of American Mosquito Control Association**, v. 15, n. 2, p. 133-152, 1999.
9. OLIVO, C. J.; HEIMERDINGER, A.; ZIECH, M. F. Extrato aquoso de fumo em corda no controle do carrapato de bovinos. **Ciência Rural**, v. 39, n.4, p. 1131-1135, 2009.
10. SOUSA, L. A. D.; SOARES, S. F.; PIRES JÚNIOR; H. B.; FERRI, P. H.; BORGES, L. M. F. Avaliação da eficácia de extratos oleosos de frutos verdes e maduros de cinamomo (*Melia azedarach*) sobre *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 36-40, 2008.
11. WILLIAMS, L. A. Adverse effects of extracts of *Artocarpus altius* Park. And *Azadirachta indica* (A. Juss) on the reproductive physiology of the adult female tick, *Boophilus microplus* (Canest.). **Invertebrate Reproduction and Development**. Jamaica, v. 23, n. 2-3, p. 159-164, 1993.